

令和 5 年 5 月 31 日現在

機関番号：14202

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20757

研究課題名(和文)新型コロナウイルス感染における血管内皮細胞障害機構の解明

研究課題名(英文) Investigate mechanism of endothelial dysfunction during SARS-CoV-2 infection

研究代表者

NGUYEN THANHCONG (Nguyen, Cong Thanh)

滋賀医科大学・医学部・特任助教

研究者番号：80910489

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、COVID-19によって活性化された内皮細胞におけるCD38発現の役割について検討した。結果は、CD38が有害な役割を果たすという当初の仮説とは異なり、CD38の発現が細胞の活性化、炎症性サイトカインの産生、低酸素応答を制御し、内皮細胞をSARS-CoV-2感染から保護することが明らかになった。また、SARS-CoV-2感染により活性化した内皮細胞では、CD38と乳酸脱水素酵素Aの発現が増加したが、ニコチンアミドモノヌクレオチドアデニルトランスフェラーゼの発現は増加しなかったことから、CD38によるNAD消費はNAD合成経路よりも低酸素応答で補われる可能性が高いと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、活性化した内皮細胞におけるCD38の発現と役割が明らかになり、COVID-19における内皮機能障害のメカニズム解明に貢献することができた。その結果、感染症におけるCD38への介入の危険性が示唆された。また、低酸素反応とNAD合成経路を同時に標的とすることで、細胞内のNAD濃度を最適化し、内皮機能障害の軽減に貢献する可能性がある。

研究成果の概要(英文)：This research aimed to define the role of CD38 expression on activated endothelial cells during SARS-CoV-2 infection. As result, in contrast to our first hypothesis of detrimental role of CD38, we found that CD38 expression played a vital role in regulating endothelial activation, inflammatory cytokine production, hypoxic response, protecting endothelial cells from stimulation by interleukin-6 and SARS-CoV-2 infection. In addition, activated endothelial cells in SARS-CoV-2-infected macaques showed an increased expression of CD38 together with lactate dehydrogenase A (LDH-A), but not nicotinamide mononucleotide adenylyl-transferase (NMNAT), suggesting that NAD consumption by CD38 could be rather compensated by hypoxic response than NAD biosynthesis pathways.

研究分野：Immunity

キーワード：CD38 SARS-CoV-2 Interleukin 6 NAD endothelial dysfunction LDH-A NMNAT

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

COVID-19 は、心血管疾患や糖尿病など基礎疾患を持つ患者に重篤な疾患を引き起こす (WHO、2020 年)。回復した患者でも、心筋炎や腎機能障害など、多臓器の後遺症が長く続くことが報告されている (Huang et al, Lancet 2020)。この後遺症と COVID-19 の重症化は、内皮細胞機能の低下と関連している可能性がある。ウイルス感染は、内皮細胞間結合の破壊、細胞の膨張、基底膜との接触の喪失を引き起こし、内皮細胞の形態を著しく変化させることが示されている (Ackermann et al, N Engl J Med 2020)。このように、既存の内皮障害や感染後の内皮障害が COVID-19 の重症度に関与している可能性はあるものの、ウイルス感染が内皮細胞にどのようにダメージを与え、その結果、全身臓器障害に至る過程は明らかではない。

Nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) は、哺乳類細胞のエネルギー代謝に關与する重要な因子である。血管内皮細胞の機能障害により NAD の代謝が阻害されることが示唆されているが、そのメカニズムは不明である。CD38 は、ウイルス感染などの炎症にตอบสนองして細胞内カルシウムシグナルを伝達し、細胞の活性化や免疫細胞の接着に關与し、NAD 消費の重要分子と言われている (Xie et al, Nature, 2020)。COVID-19 による内皮細胞の機能障害を解明するため、カニクイザルを用いた SARS-CoV-2 感染実験を行い、炎症部位の細胞の CD38 を介した活性化を観察した。その結果、感染したサル肺、心臓、腎臓の内皮細胞で CD38 分子が高発現していることを発見した。

低酸素-再酸素化条件下では、CD38 は内皮細胞に強く発現し、著しい nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) 消費、一酸化窒素の喪失、スーパーオキシド産生の増加を伴う内皮機能障害と関連しているという報告がある (Boslette et al, Am J Physiol Cell Physiol, 2018)。ミトコンドリア酸化ストレス状態は、細胞内 NAD 代謝および Sirtuin-3 活性に關連するメカニズムを通じて、尿細管細胞における CD38 発現も増加させる (Barbosa et al, FASEB J 2007)。また、Chang らは、内皮細胞におけるミトコンドリア機能不全の寄与を示唆している (Front Physiol 2020)。しかし、SARS-CoV-2 に感染した内皮細胞における CD38 や低酸素による細胞障害やミトコンドリア酸化ストレスのメカニズムは明らかではない。

2. 研究の目的

本研究では、ヒト臍帯血管内皮細胞 (HUVEC) 細胞株を用いて、in vitro での内皮細胞機能不全を解析する。内皮細胞の低酸素再酸素化条件および/またはミトコンドリア酸化ストレス (合併症を想定) 下で SARS-CoV-2 を感染させ、ストレスがない場合の内皮細胞反応と比較する。これにより、合併症がある場合の COVID-19 重症化メカニズムを明らかにする。また、NAD 代謝と CD38 発現の両方に關連する低酸素およびミトコンドリア酸化ストレスに介入し、重症化治療の基盤となる分子メカニズムを探索する。

3. 研究の方法

A. 低酸素-再酸素化状態および/またはミトコンドリアの酸化ストレス状態における SARS-CoV-2 感染

化学的な低酸素誘導剤である塩化コバルト (II) 六水和物 (CoCl_2) (Wu et al, J Vis Exp 2011) を HUVEC 細胞培養液に添加して低酸素状態を作り出す。また、ドキソルピシン含有培地を用いて、内皮細胞にミトコンドリア酸化ストレスを誘導する (Clayton et al, JACC CardioOncol 2020)。次に、この細胞に SARS-CoV-2 を感染させ、様々な時間経過後に上清と細胞を回収し、遺伝子およびタンパク質の発現解析を行う。

上清や細胞中の CD38、アンジオポエチン-1,2、フォンビルブランド因子、トロンボモジュリン、E-セレクトイン (内皮活性化マーカー) は ELISA、ウェスタンブロット、免疫組織化学染色または qRT-PCR で測定する。また、内皮細胞から分泌されるサイトカイン IL-6、IL-8、IP-10 をビーズアレイアッセイ、ELISA または RT-PCR により測定する。

B. SARS-CoV-2 感染サル組織を用いた発現解析

上記 A において発現に変化の見られた遺伝子及び分子の発現を、以前の研究において得られた SARS-CoV-2 感染サル組織、血液サンプルを使い、測定し、実際の感染個体内での反応と比較する。

C. CD38 阻害剤の効果

内皮細胞障害の原因として、CD38 発現の上昇と CD38 を介したシグナル増強が仮説として挙げられた。したがって、CD38 阻害剤は、低酸素-再酸素化条件および/またはミトコンドリア酸化ストレスの影響を軽減すると考えられる。CD38 の病原性への関与を証明するために、アピゲニン、ルテオルニジン、siRNA ノックダウンなどの CD38 阻害剤によって *in vitro* で SARS-CoV-2 感染内皮細胞の機能不全を低減する効果を測定した (Boslette et al, Am J Physiol Cell Physiol, 2018; Ogura et al, Aging 2020)。

4. 研究成果

▪ SARS-CoV-2 を感染させた HUVEC の細胞形態と CD38 発現は 72 時間変わらない

最初に HUVEC に SARS-CoV-2 を三つのウイルスの濃度(multiplicity of infection MOI=0.1, 1, 10)で感染させたが、24~72 時間後、細胞の形態に変化はなく、培養上清中にウイルスも検出されなかった。また、細胞内 CD38、サイトカインの IL-6、低酸素誘導性因子の HIF-1a 及びミトコンドリア障害マーカー OPA1、DRP1 の mRNA 量に変化はみられなかった。低酸素 再酸素化(CoCl₂ 投与) またはミトコンドリア酸化ストレス(ドキシソルビシン投与)条件下に HUVEC を培養し、SARS-CoV-2 を感染させても細胞の形態は変わらず、培養上清中にウイルスは検出されなかった。この結果は最近の報告 (Urata et al, Sci. Rep. 2022) と一致して、SARS-CoV-2 が HUVEC に直接感染しないことを示唆した。

▪ サイトカインによる内皮細胞における CD38 発現は細胞を保護する。

SARS-CoV-2 感染後 1 日目のカニクイザル血漿では IL-6 を含むサイトカイン濃度が高くなる (Ishigaki et al, Virology 2020)。重症 COVID-19 患者の血漿では可溶性 IL-6 と IL-6R が増加していることが報告され (Koutsakos et al, Cell Rep Med 2021)、さらに IL-6 と IL-6R の複合体が内皮細胞の活性化に関与していることも報告されている(Kang et al, PNAS 2020)。そこで、内皮細胞の活性化と機能障害の機構を明らかにするため、IL-6 と IL-6R の組み合わせ (IL6+IL6R) を使用して、*in vitro* で HUVEC (IL6R の発現がない)における CD38 の発現と CD38 の役割をさらに調べた。SARS-CoV-2 は HUVEC の非活性化内皮細胞ではなく、活性化内皮細胞に感染するのではないかと仮説を立てたが、IL6+IL6R の刺激で SARS-CoV-2 の受容体である ACE2 の mRNA 発現は不変であった。IL6+IL6R の刺激後、HUVEC では VCAM-1 と E-selectin の mRNA 量 (内皮細胞の活性化マーカー)の上昇とともに、IL-6、Hif-1a (6 時間後)、CD38、OPA-1、DRP-1 (72 時間後) の mRNA 量も増加した。この結果から活性化内皮細胞において CD38 発現、サイトカイン産生、低酸素応答とミトコンドリア不全が起こると考えられた。次に、CD38 の発現が低酸素応答とミトコンドリア酸化ストレスに与える影響を、CD38 siRNA 投与で CD38 の発現を抑制し調べた。CD38 を欠損した HUVEC を IL-6 + IL-6R により刺激すると、6 時間後欠損しない細胞に比べて E-selectin、IL-6 及び HIF-1a の mRNA が多く発現した、2 日 3 日後、多くの細胞に apoptosis マーカーである Annexin V が見られ、細胞が死滅した。この結果からサイトカインにより活性化させた内皮細胞では CD38 の発現が増加し、CD38 はサイトカイン産生及び低酸素応答を抑制し、刺激に対して過剰反応にならないように細胞を保護する役割を持つことが明らかになった。

内皮細胞障害の原因として、CD38 発現の上昇と CD38 を介したシグナル増強が仮説として挙げられた。したがって、CD38 欠損又は CD38 阻害剤は、低酸素-再酸素化条件および/またはミトコンドリア酸化ストレスの影響を軽減すると考えられる。しかし、CD38 欠損した細胞を刺激すると、E-selectin、IL-6 及び HIF-1a の mRNA 量がさらに増加し、細胞死を促進するようになった。この結果は仮説とは逆に CD38 は内皮細胞の障害が過剰にならないように発現が上昇し、サイトカイン産生と低酸素応答の過剰を抑制する役割をもつと考えられた。

▪ COVID-19 後、カニクイザル肺の内皮細胞における NAD 合成として合成低酸素応答の役割

CD38 は、ウイルス感染などの炎症に応答して NAD を消費する重要な分子と言われている (Xie et al, Nature, 2020)。そこで、SARS-CoV-2 に感染したサル肺の血管内皮細胞において、NAD の消費を補うための NAD 合成の変化を解析した。

NAD の合成には、次の三つの経路がある。生理的条件下で、(1) *de novo* 経路では、NAD は

Tryptophan から Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) 酵素の働きで新規に合成され、(2) salvage 経路では、nicotinamide mononucleotide adenylyl-transferase (NMNAT) 酵素の働きで NAD を消費した際に生じる分解産物 (NAM) をリサイクルして NAD が再合成される。(3) ビタミン B3 など を添加すると、Preiss-Handler 経路の Nicotinate phosphor-ribosyl-transferase (NAPRT) 酵素の働きで NAD 生合成ができる。(1)(2)(3) の経路に共通するのは NMNAT 酵素を必要とすることである。また、低酸素条件又はポリ多糖等による刺激される状態では低酸素応答が起こり、解糖系でピルビン酸のアセチル CoA への転換を抑制し、乳酸脱水素酵素 A (lactate dehydrogenase A, LDH-A) により乳酸となり、NAD が還元型 NAD (NADH) より産生される。この経路の解析のために SARS-CoV-2 感染後、内皮細胞の CD38 発現と共に、IDO, NAPRT, NMNAT, LDH-A の発現を調べた。その結果、内皮細胞において感染後 IDO, NAPRT, LDH-A の発現が増加したが NMNAT の発現は不変である事が分かった。IDO, NAPRT の発現増加が見られたが、NMNAT の発現の増加がなかったため de novo, Preiss-Handler, salvage 経路からの NAD 合成が増加しない可能性がある。一方、低酸素応答に関する LDH-A の発現増加が見られ、低酸素応答の経路で NAD 合成に寄与する可能性があると考えられた。サルの肺炎重症度を問わずに血管内皮細胞において LDH-A が発現したので、重症肺炎による低酸素条件だけではなく、サイトカイン等で刺激された結果として内皮細胞に低酸素応答が誘導されたと推察された。NAD 前駆体の補給及び低酸素応答を介して NAD ブーストは、ウイルス感染症による内皮細胞障害を防ぐ可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Cong Thanh Nguyen
2. 発表標題 Distribution of CD38-positive immune cells, endothelial cells, and renal tubular cells in cynomolgus macaques infected with SARS-CoV-2
3. 学会等名 The 50th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Cong Thanh Nguyen
2. 発表標題 Increased IDO, CD38 and LDH expression in lung macrophages and endothelial cells indicating NAD+ dysmetabolism in cynomolgus macaques infected with SARS-CoV-2
3. 学会等名 The 51st Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	伊藤 靖 (Itoh Yasushi)		
研究協力者	仲山 美佐子 (Nakayama Misako)		

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	宗 陽向 (So Hinata)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計1件

国際研究集会 第50回日本免疫学会学術集会	開催年 2021年～2021年
--------------------------	--------------------

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関